

## Введение в лизин остатков детиобиотина и малеимида

Чубаров А.С.,<sup>\*а,б</sup> Кудряшова Н.В.<sup>б</sup>

<sup>а</sup> Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск

<sup>б</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины, пр. Лаврентьева, 8, Новосибирск

В рамках работы было синтезировано производное на основе лизина, содержащее в качестве репортёрной группы остаток детиобиотина, для введения которого в белок использовали остаток малеимида, реакционноспособный в отношении тиольных групп белков. Для этого по карбоксильной группе  $N_\alpha$ -Вос- $N_\epsilon$ -Z-сукцинимидного эфира лизина ввели этилендиаминовый линкер, свободную аминогруппу которого ацилировали с помощью пентафторфенилового эфира детиобиотина. После восстановления Z-защитной группы гидрогенолизом на палладиевом катализаторе по  $\epsilon$ -аминогруппе лизина ввели остаток 6-малеимидгексановой кислоты; в этой реакции использовали пентафторфениловый эфир кислоты. Полученные соединения были охарактеризованы с помощью методов ТСХ и ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

### Введение

Аффинные сорбенты на основе авидина и стрептавидина широко используются в биохимии и медицине. Как авидин, так и стрептавидин — белки, состоящие из четырёх идентичных субъединиц, каждая из которых имеет один независимый центр связывания биотина, который характеризуется высоким сродством ( $K_d \sim 10^{-14}$  М)<sup>1</sup>. Прочное связывание остатка биотина, введённого в структуру биополимеров, обеспечивает выделение последних из образцов за счёт связывания с аффинными сорбентами. Однако высокое сродство лиганда к авидину и стрептавидину создаёт проблему использования метода конкурентного элюирования свободным лигандом для десорбции макромолекул с носителя. Решить данную проблему можно путём замены остатка биотина на его производное — детиобiotин.

Известно<sup>2</sup>, что, несмотря на отсутствие в составе детиобиотина гетероцикла, включающего атом серы, он способен связываться как с авидином, так и со стрептавидином. Было показано, что и биотин, и детиобiotин связываются с одними и теми же центрами белка. При этом было обнаружено, что лиганд с меньшим сродством (остаток детиобиотина) конкурентно вытесняется из состава комплексов биотином<sup>2</sup>. Таким образом, мечение биополимеров остатками детиобиотина, обеспечит возможность выделения из биологических образцов макромолекул путём адсорбции их на аффинном сорбенте, а также позволит осуществить их эффективное биоспецифическое элюирование с носителя.

Цель данной работы — синтез производного лизина, несущего остаток детиобиотина и малеимида, реакционноспособного в отношении сульфгидрильных групп белков.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы следующие реактивы:  $N_\alpha$ -(трет-бутилоксикарбонил)- $N_\epsilon$ -(карбобензоксид)- $N$ -сукцинимидный эфир лизина, 1,2-диаминоэтан (Fluka, Швейцария), детиобiotин

(Sigma, США), малеиновый ангидрид, 6-аминогексановая кислота, пентафторфенол (Реахим, Россия), дициклогексилкарбодиимид (Sigma, США), силикагель (230–400 меш, размер пор 60 нм) (Macherey-Nagel, Германия), нингидрин (Chemapol, Чехословакия). Пентафторфениловый эфир детиобиотина был синтезирован аналогично 2-нитро-4-сульфопенилового эфиру биотина согласно методике<sup>3</sup>. Пентафторфениловый эфир 6-малеимидгексановой кислоты был синтезирован согласно<sup>4</sup>.

ТСХ выполняли на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Германия) с использованием в качестве элюента систем: хлороформ / метанол 3 : 2 (v/v) — система А; хлороформ / метанол 9 : 1 (v/v) — система Б. Положение на пластинах соединений, содержащих аминогруппы, детектировали по образованию окрашенных пятен при реакции с нингидрином (0,1 % раствор в смеси этанол / ледяная уксусная кислота 4 : 1 (v/v)) при нагревании<sup>5</sup>.

Концентрирование образцов осуществляли упариванием на вакуумном ротационном испарителе Rotavapor RE120 (Buchi, Швейцария).

<sup>13</sup>C-, <sup>19</sup>F-ЯМР спектры записывали на спектрометре AM-400 (Bruker, Германия) (рабочая частота 100 и 376 МГц, соответственно). Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР записывали на спектрометре DRX-500 (Bruker, Германия), рабочая частота 500 МГц. Запись спектров осуществляли при 25 °С в 5 мм ампуле. В случае <sup>1</sup>H-спектров все химические сдвиги оценены относительно растворителей: DMF, ацетон, вода. Для <sup>19</sup>F-спектров внешним стандартом был C<sub>6</sub>F<sub>6</sub> (0,0 м.д.). Приведены химические сдвиги в шкале  $\delta$  и константы спин-спинового взаимодействия в J, Гц.

Масс-спектры высокого разрешения получали на спектрометре LC/MSD Trap XCT (Agilent Technologies, США).

**Получение  $N_\alpha$ -(трет-бутилоксикарбонил)- $N_\epsilon$ -(карбобензоксид)-лизилэтиленди-амидодеиобиотина (1).**  $N_\alpha$ -(трет-бутилоксикарбонил)- $N_\epsilon$ -(карбобензоксид)-

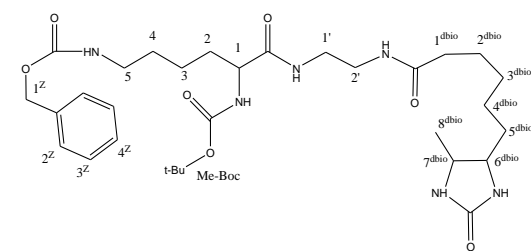


Рис. 1. Соединение 1

сукцинимидный эфир лизина (72 мг, 150 мкмоль) растворили в сухом DMF (180 мкл) и добавили 1,2-диаминоэтан (10 мкл, 150 мкмоль), раствор перемешивали в течение 2 ч при 25°C. Осадок центрифугировали и к раствору добавляли 0,3 мл DMF, после чего приливали раствор пентафторфенилового эфира дитиобиотина (насыщенный при 0°C в этилацетате, 70 мкл). Смесь перемешивали при 25°C в течение 1,5 ч. Растворитель упаривали.

Выход соединения (1) (см. рис. 1) 63 мг, 100 мкмоль (65%), ТСХ:  $R_f$  0,65 (система А); 0,36 (система Б).  $^1\text{H}$ -ЯМР (DMF)  $\delta$ , м.д.: 1,24 (д, 3H,  $J=6,43$ ,  $\text{H}-8^{\text{dbio}}$ ); 1,56 (с, 9H, Me-Boc); 1,64 (м, 8H,  $\text{H}-3$ ,  $\text{H}-3^{\text{dbio}}$ ,  $\text{H}-4^{\text{dbio}}$ ,  $\text{H}-5^{\text{dbio}}$ ); 1,77 (м, 2H,  $\text{H}-2^{\text{dbio}}$ ); 1,90 (м, 4H,  $\text{H}-2$ ,  $\text{H}-4$ ); 2,87 (т, 2H,  $\text{H}-1^{\text{dbio}}$ ,  $J=7,14$ ); 3,27 (м, 2H,  $\text{H}-5$ ,  $J=6,11$ ); 3,46 (м, 5H,  $\text{H}-1'$ ,  $\text{H}-2'$ ,  $\text{H}-1$ ); 3,83 (м, 1H,  $\text{H}-6^{\text{dbio}}$ ); 3,95 (м, 1H,  $\text{H}-7^{\text{dbio}}$ ); 5,24 (с, 2H,  $\text{H}-1^z$ ); 7,35 (т, 1H,  $\text{H}-4^z$ ,  $J=5,24$ ); 7,54 (м, 4H,  $\text{H}-2^z$ ,  $\text{H}-3^z$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (DMF)  $\delta$ , м.д.: 15,22 ( $8^{\text{dbio}}$ ); 24,96 (3); 25,13 ( $2^{\text{dbio}}$ ); 26,05 ( $4^{\text{dbio}}$ ); 27,69 (Boc-Me); 29,10 ( $3^{\text{dbio}}$ ); 29,84 (4); 30,47 (2); 31,87 ( $5^{\text{dbio}}$ ); 34,02 ( $1^{\text{dbio}}$ ); 35,69 (5); 38,64 ( $2'$ ); 40,26 ( $1'$ ); 51,22 ( $7^{\text{dbio}}$ ); 54,73 (1); 55,93 ( $6^{\text{dbio}}$ ); 65,42 ( $1^z$ ); 78,48 (Boc t-C); 127,54; 127,70; 128,31; 137,35 ( $\text{Ph}^z$ ); 155,85 ( $\text{C}=\text{O}$ , Boc); 156,71 ( $\text{C}=\text{O}$ , Z); 162,24 ( $\text{C}=\text{O}$ , Lys); 164,08 ( $\text{C}=\text{O}^{\text{dbio}}$  в цикле); 175,46 ( $\text{C}=\text{O}^{\text{dbio}}$ ). Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  528,4 [ $\text{M}-\text{PhCH}_2+\text{H}$ ] $^+$ .  $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{N}_6\text{O}_7$ . Вычислено: [ $\text{M}-\text{PhCH}_2+\text{H}$ ] $^+$  528,4.

**Пентафторфениловый эфир дитиобиотина (рис 2):**  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ , м.д.: 1,11 (д, 3H,  $J=6,43$ ,  $\text{H}-8^{\text{dbio}}$ ); 1,53 (м, 6H,  $\text{H}-3^{\text{dbio}}$ ,  $\text{H}-4^{\text{dbio}}$ ,  $\text{H}-5^{\text{dbio}}$ ); 1,80 (м, 2H,  $\text{H}-2^{\text{dbio}}$ ); 2,81 (т, 2H,  $\text{H}-1^{\text{dbio}}$ ,  $J=7,14$ ); 3,71 (м, 1H,  $\text{H}-7^{\text{dbio}}$ ); 3,81 (м, 1H,  $\text{H}-6^{\text{dbio}}$ ); 6,04 (с, N-H); 6,38 (с, N-H).  $^{19}\text{F}$ -ЯМР: -3,18 (м, F-2); 1,09 (т, F-3,  $J=21,24$ ); 6,70 (м, F-1).

**Синтез  $N_\alpha$ -(*трет*-бутилоксикарбонил)-лизилэтилендиамидодитиобиотина (2).** Соединение 1 (63 мг, 100 мкмоль) растворяли в 0,6 мл метанола и добавляли 20 мг катализатора  $\text{PdO}_2/\text{C}$ . При интенсивном перемешивании раствор гидрировали в течение 15-20 ч при 25°C. После окончания реакции катализатор отфильтровывали. Разделение образовавшихся продуктов проводили колоночной хроматографией на силикагеле (колонка 0,5 x 10 см, объем сорбента 5 мл), элюировали градиентом

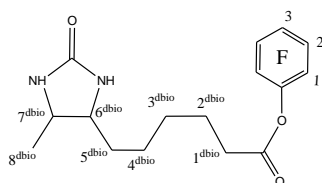


Рис. 2. Пентафторфениловый эфир дитиобиотина

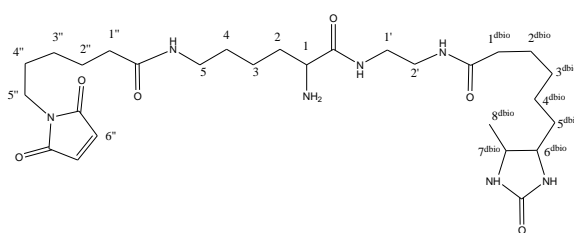


Рис. 3. Соединение 3

метанола в хлороформе (0; 0,5; 1), пики идентифицировали с помощью ТСХ. Растворитель упаривали. Выход 35 мг, 70 мкмоль (70%). ТСХ:  $R_f$  0,58 (система А); 0,22 (система Б).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ , м.д.: 1,01 (д, 3H,  $J=6,43$ ,  $\text{H}-8^{\text{dbio}}$ ); 1,25 (м, 4H,  $\text{H}-3$ ,  $\text{H}-4$ ); 1,33 (с, 9H, Me-Boc); 1,42 (м, 4H,  $\text{H}-3^{\text{dbio}}$ ,  $\text{H}-4^{\text{dbio}}$ ); 1,50 (м, 2H,  $\text{H}-5^{\text{dbio}}$ ); 1,64 (м, 4H,  $\text{H}-2^{\text{dbio}}$ ,  $\text{H}-2$ ); 2,13 (т, 2H,  $\text{H}-1^{\text{dbio}}$ ,  $J=7,14$ ); 2,37 (т, 2H,  $\text{H}-5$ ,  $J=6,11$ ); 3,25 (м, 5H,  $\text{H}-1'$ ,  $\text{H}-2'$ ,  $\text{H}-1$ ); 3,81 (м, 1H,  $\text{H}-6^{\text{dbio}}$ ); 3,86 (м, 1H,  $\text{H}-7^{\text{dbio}}$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ , м.д.: 15,22 ( $8^{\text{dbio}}$ ); 24,96 (3); 25,13 ( $2^{\text{dbio}}$ ); 26,05 ( $4^{\text{dbio}}$ ); 27,45 (Boc-Me); 29,10 ( $3^{\text{dbio}}$ ); 29,87 (4); 30,46 (2); 31,22 ( $5^{\text{dbio}}$ ); 34,22 ( $1^{\text{dbio}}$ ); 36,76 (5); 38,23 ( $2'$ ); 42,47 ( $1'$ ); 51,38 ( $7^{\text{dbio}}$ ); 55,85 (1); 57,26 ( $6^{\text{dbio}}$ ); 79,68 (Boc t-C); 156,45 ( $\text{C}=\text{O}$ , Boc); 162,44 ( $\text{C}=\text{O}$ , Lys); 164,80 ( $\text{C}=\text{O}^{\text{dbio}}$  в цикле); 177,56 ( $\text{C}=\text{O}^{\text{dbio}}$ ).

**Получение  $N_\epsilon$ -(6-малеимидгексанил)-лизилэтилендиамидодитиобиотина (3) (рис. 3).**

Соединение 2 (85 мг, 170 мкмоль) растворяли в 200 мкл метанола и добавляли пентафторфениловый эфир 6-малеимидгексановой кислоты (77 мг, 200 мкмоль), раствор перемешивали при 25°C в течение 4 ч, после чего подвергали колоночному разделению на силикагеле (колонка 0,5 x 10 см, объем сорбента 5 мл), элюировали градиентом метанола в хлороформе (0; 50%; 100%). Продукты идентифицировали с помощью ТСХ. Растворитель упаривали и к остатку добавляли муравьиную кислоту (0,3 мл) для деблокирования  $N_\alpha$ -*трет*-бутилоксикарбонильной защитной группы. Реакционную смесь выдерживали в течение 2 ч.

Выход 40 мг, 68 мкмоль (40 %). ТСХ:  $R_f$  0,62 (система А).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ )  $\delta$ , м.д.: 1,01 (д, 3H,  $J=6,43$ ,  $\text{H}-8^{\text{dbio}}$ ); 1,43 (м, 6H,  $\text{H}-3^{\text{dbio}}$ ,  $\text{H}-3''$ ,  $\text{H}-3$ ); 1,61 (м, 8H,  $\text{H}-4^{\text{dbio}}$ ,  $\text{H}-4''$ ,  $\text{H}-4$ ,  $\text{H}-5^{\text{dbio}}$ ); 1,77 (м, 6H,  $\text{H}-2^{\text{dbio}}$ ,  $\text{H}-2''$ ,  $\text{H}-2$ ); 2,13 (т, 2H,  $\text{H}-1^{\text{dbio}}$ ,  $J=7,14$ ); 2,26 (т, 2H,  $\text{H}-5$ ,  $J=6,11$ ); 2,77 (т, 2H,  $\text{H}-1''$ ,  $J=7,14$ ); 3,25 (м, 4H,  $\text{H}-1'$ ,  $\text{H}-2'$ ); 3,45 (т, 2H,  $J=6,98$ ,  $\text{H}-1$ ); 3,49 (т, 2H,  $J=6,95$ ,  $\text{H}-5''$ ); 3,81 (м, 1H,  $\text{H}-6^{\text{dbio}}$ ); 3,86 (м, 1H,  $\text{H}-7^{\text{dbio}}$ ); 6,85 (с, 2H,  $\text{H}-6''$ ). Масс-спектр: Найдено:  $m/z$  573,4 [ $\text{M}-4\text{H}$ ] $^-$ .  $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_6$ . Вычислено: [ $\text{M}-4\text{H}$ ] $^-$  573,4. Найдено:  $m/z$  407,2 [ $\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ ] $^-$ .  $\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_6$ . Вычислено: [ $\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ ] $^-$  407,2.

## Результаты и обсуждение

Синтез соединения 3 проводили, используя методы пептидной химии<sup>6</sup> на схеме 1.

Для введения в белок остатка дитиобиотина в качестве репортёрной группы нами был сконструирован реагент на основе лизина, содержащий остатки дитиобиотина и малеимида. С помощью остатка малеимида можно

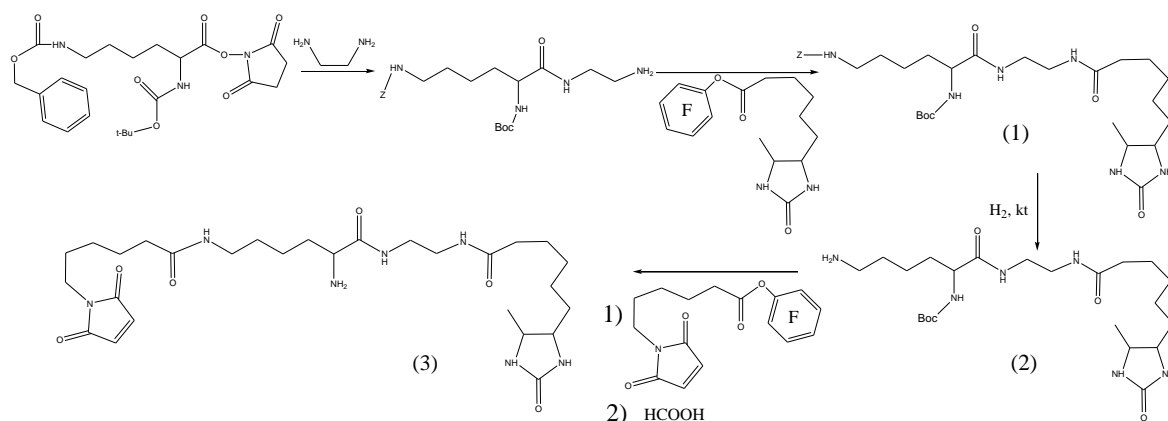


Схема 1. Схема реакции получения соединения 3

модифицировать SH-группы бокового радикала цистеина белка<sup>7-9</sup>. Введение остатка малеимида в лизин осуществляли после присоединения дитиобиотиновой группы, чтобы исключить реакцию взаимодействия малеимида с аминогруппой реагента. Согласно данным <sup>1</sup>H-ЯМР спектроскопии остаток малеимида и свободная α-аминогруппа лизина в реагенте **3** не взаимодействуют друг с другом. Кроме того, деблокирование Boc-защитной группы приводит к увеличению растворимости бифункционального реагента.

Введение дитиобиотиновой группы в лизин осуществляли с помощью пентафторфенилового эфира дитиобiotина, который был синтезирован впервые. Выбор данного эфира обусловлен его устойчивостью к гидролизу, а также быстротой взаимодействия с аминогруппой по сравнению с другими активированными эфирами<sup>4</sup>.

Присоединение этилендиаминового спейсера было сопряжено с небольшими трудностями, так как возможно присоединение двух молекул лизина на одну молекулу этилендиамина. Данную проблему мы решили подбором концентрации последнего.

Синтезированный нами реагент будет использован для мечения белков в биологических образцах и разделения их на аффинных сорбентах.

Работа выполнена при поддержке интеграционного гранта № 88 СО РАН, НШ-3185.2010.4 и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 09-04-01483-а).

Авторы сердечно благодарят: В.В. Кандаурову за помощь в регистрации ЯМР-спектров.

### Библиографический список

- 1 Green N.M. // *Advances in Protein*. **1975**. V. 29. P. 85-133.
- 2 Орлова Т.Н. // Создание нерадиоактивного высокочувствительного гибридационного метода детекции вируса клещевого энцефалита. Дис. ... канд. хим. наук. Новосибирск. **1996**. 152 с.
- 3 Гершкович А.А., Серебряный С.Б. // *Биоорганическая химия*. **1979**. Т. 5. С. 1125-1132.
- 4 Kida S., Maeda M., Hojo K., Eto Y., Nakagawa S., Kawasaki K. // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2007**. V. 55. P. 685-687.
- 5 Досон Р., Эллиот Д., Эллиот Т., Джонс К. *Справочник биохимика*. М.: Мир, **1991**.
- 6 Гершкович А.А., Кибирев В.К. *Синтез пептидов. Реагенты и методы*. Киев: Наукова думка, **1987**.
- 7 Wang D., Li Q., Hudson W., Berven E., Uckun F., Kersey J.H. // *Bioconjugate Chemistry*. **1997**. V. 8. P. 878-884.
- 8 Junutula J. R., Bhakta S., Raab H., Ervin K.E. // *Journal of Immunological Methods*. **2008**. V. 332. P. 41-52.
- 9 Beduneau A., Saulnier P., Hindre F., Clavreul A. // *Biomaterials*. **2007**. V. 28. P. 4978-4990.